

## REACCIONES POSITIVAS FALSAS DE BACTERIAS COLIFORMES DEBIDAS A LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis* \*

F. C. González (1), María C. Mans de Marión (1), J. C. Mussini (1) y W. A. Scheffers (2)

Recibido: 5/8/81

Aceptado: 21/10/81

### RESUMEN

Una levadura aislada de suero-fermento de quesos e identificada como *Kluyveromyces lactis*, produce reacciones positivas en caldo de Mac Conkey a 37°C con incubación de 48 horas y también a 44°C con incubación de 24 horas; forma colonias típicas rojo oscuras en agar desoxicolato y colonias pequeñas, nucleadas y de brillo verdoso metálico en agar Levine, ambos medios incubados a 37°C durante 48 horas. Por otro lado, esta levadura no desarrolla en medios que contengan un colorante del grupo del trifenilmetano.

Dado que en los análisis de rutina se suelen utilizar medios carentes de tales colorantes y, además, se omite el examen microscópico de la coloración de Gram del microorganismo, son probables los resultados positivos falsos en los análisis de detección de bacterias coliformes.

### A YEAST, *Kluyveromyces lactis*, GIVING FALSE POSITIVE COLIFORM REACTIONS

### SUMMARY

A yeast, identified as *Kluyveromyces lactis* isolated from cheese starter, produces false coliform positive reactions and also fecal type coliform reactions. It produces gas in Mac Conkey broth at 37°C within 48 hours and also at 44°C within 24 hours. It forms typical dark red colonies on desoxycholate agar and small nucleated colonies with greenish metallic sheen on Levine agar, both media incubated at 37°C within 48 hours. On the other hand, this yeast is strongly suppressed in media containing a triphenylmethane colorant.

Since in routine practice media without such colorants are used and the microscopical examination of a Gram stained smear of the microorganism is frequently omitted, false coliform positive results might be recorded.

---

\* Un resumen de este trabajo fue publicado en los Documentos de Trabajo, Tema 4 b: Alteraciones Microbiológicas de Alimentos, del IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, realizado en Madrid del 23 al 27 de septiembre de 1974.

- (1) Cátedra de Microbiología Agrícola, Departamento de Industrias Agrícolas y Alimentarias, Facultad de Agronomía UBA, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, Argentina.
- (2) Laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica de Delft, Holanda, Julianalaan 66, Delft, Holanda.

## INTRODUCCION

Las pruebas de detección de bacterias coliformes (*Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*) suelen efectuarse utilizando un medio de cultivo selectivo, por su alta concentración de sales biliares y con lactosa como único azúcar. En este medio, las bacterias coliformes pueden desarrollar y fermentar dicho azúcar con producción de gas, propiedad que sirve, justamente, para detectar la presencia de este grupo bacteriano. Sin embargo, puede haber producción de gas en tales medios por microorganismos no coliformes. Estos resultados positivos falsos son debidos, según la bibliografía, (Folpners, 1948; Salle, 1965; Wattie, 1948) a asociaciones sinérgicas bacterianas formadas por dos especies, una de ellas Gram positiva. Se conocen varias asociaciones de diferentes especies. Si se diera una de tales asociaciones, se produciría gas, aún cuando ninguna de las dos especies es capaz de producirlo por separado. Para evitar estos resultados positivos falsos es necesario que el medio que se utilice contenga algún colorante de trifenilmetano, inhibidor de los Gram positivos, (North, 1960), o de lo contrario, ya que es común la utilización de medios que no lo contienen, la observación microscópica de una tinción de Gram de la microflora desarrollada en el medio utilizado. Como estos recaudos suelen no tenerse en cuenta en los análisis de rutina que efectúan diversos laboratorios se creyó de interés el estudio del comportamiento de una levadura que fue observada durante la detección de bacterias coliformes en un suero-fermento de quesos en la idea de que dado su carácter Gram positivo y su presencia, en gran cantidad, en medios de Mac Conkey donde, además, se observó producción de gas, pudiera tratarse de un microorganismo capaz de dar resultados positivos falsos.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio que se describe en este traba-

jo, se efectuó, previo aislamiento e identificación de la levadura mencionada, utilizando la metodología recomendada por normas de identificación de bacterias coliformes y de diferenciación de coli fecal y no fecal de aceptación universal (American Public Health Association, 1966 y 1972; Edwards y Ewing, 1972).

### 1) Aislamiento de la levadura en estudio

Se efectuó por siembra en superficie en mosto de malta de pH 4,5 y posterior aislamiento monocitogénico siguiendo la técnica de Lindher (Jørgensen, 1959). Mediante este procedimiento se aislaron 30 cultivos (cepas) procedentes cada uno de ellos, de una sola célula.

### 2) Pruebas de identificación de la levadura en estudio

Se siguió la metodología detallada por Lodder (1970) efectuándose las siguientes pruebas:

- a) Morfología y tamaño de las células.
- b) Características de la reproducción vegetativa.
- c) Formación de esporas y características de éstas.
- d) Formación de películas en medios líquidos.
- e) Utilización fermentativa de compuestos carbonados.
- f) Utilización oxidativa de compuestos carbonados.
- g) Utilización de compuestos nitrogenados.
- h) Desdoblamiento de arbutina.
- i) Hidrólisis de urea.
- j) Desarrollo en medios libres de vitaminas.
- k) Desarrollo en medios con alta presión osmótica.
- l) Desarrollo a temperaturas elevadas.

### 3) Pruebas de identificación de bacterias coliformes y de caracterización de coli fecal y no fecal.

CUADRO 1: Resumen de los resultados obtenidos.

Prueba	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Escherichia coli</i> Tipo I (coli fecal)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (coli no fecal)	<i>Escherichia coli</i> Tipo I <i>Enterobacter aerogenes</i> (coliformes)
a.a. Producción de gas en Mac Conkey s/cristal violeta	+	+	+	+
a.b. Producción de gas en Mac Conkey c/cristal violeta	—	+	+	+
b. Producción de gas en bilis verde brillante	—	+	+	+
c. Desarrollo de colonias típicas en agar Endo	—	+ (1)	+ (1)	+ (1)
d. Desarrollo de colonias típicas en agar desoxicolato.	+ (1)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
e. Desarrollo de colonias típicas en agar Levine	+ (2)	+ (2)	+ (3)	n. c.
f.a. Producción de indol	—	—	—	n. c.
f.b. Rojo de metilo	—	+	—	n. c.
f.c. Voges-Proskauer	—	—	+	n. c.
f.d. Utilización de citratos	—	—	+	n. c.
g.a. Eijkman en Mac. Conkey s/cristal violeta	+	+	—	n. c.
g.b. Eijkman en Mac Conkey c/cristal violeta	—	+	—	n. c.
g.c. Eijkman en bilis verde brillante	—	+	—	n. c.
h. Producción de indol a $44.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	—	+	—	n. c.

n. c.: no corresponde la prueba para ese grupo de bacterias.

(1): tipo coliforme, prueba c - colonias de color rojo intenso con brillo dorado metálico, tipo coliforme, prueba d - colonias de color rojo oscuro.

(2): tipo coli fecal, prueba e - colonias pequeñas, de centro oscuro, con brillo verde metálico.

(3): tipo coli no fecal, prueba e - colonias grandes, rosadas y mucosas.

La levadura en estudio fue sometida a las siguientes pruebas:

- a) Producción de gas en medio de Mac Conkey, a 37°C de temperatura:

a.a. sin cristal violeta.  
con 0,001% de cristal violeta.

- b) Producción de gas en medio de bilis verde brillante a 37°C de temperatura.  
c) Desarrollo de colonias típicas en medio de agar Endo.  
d) Desarrollo de colonias típicas en medio de agar desoxicolato.  
e) Desarrollo de colonias típicas en medio de agar Levine.  
f) Pruebas de IMVIC. Se efectuaron con incubación a 37°C:

f.a. producción de indol.  
f.b. rojo de metilo.  
f.c. Voges-Proskauer.  
f.d. utilización de citratos.

- g) Prueba de Eijkman, a 44°C  $\pm$  0,5°C; esta prueba se efectuó en diferentes medios.

g.a. medio de Mac Conkey sin cristal violeta.  
g.b. medio de Mac Conkey con cristal violeta.  
g.c. medio de bilis verde brillante.

- h) Prueba de producción de indol a 44°C  $\pm$  0,5°C.

## RESULTADOS Y CONSIDERACIONES

Las pruebas efectuadas con la levadura en estudio, identificadas como *Kluyveromyces lactis*, fueron asimismo realizadas, a modo de control, con cepas de *Escherichia coli* (coli fecal), *Enterobacter aerogenes* (coli no fecal) y una mezcla de ambas (coliformes).

Cada uno de los 30 cultivos de la levadura, obtenidos a partir de aislamientos monocitogenéticos, fue sometido a todas las pruebas realizadas en este trabajo, de modo que

la columna correspondiente a *Kluyveromyces lactis* consigna en realidad, los resultados de 30 ensayos, todos los cuales fueron coincidentes.

## CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que las cepas estudiadas de la levadura *Kluyveromyces lactis* producen resultados positivos falsos en las determinaciones que se utilizan para detectar coliformes y también en los ensayos que se realizan para diferenciar coli fecal de coli no fecal, cuando en los medios de cultivo empleados no se incluya un colorante del grupo del trifenilmetano (cristal violeta, verde brillante, fucsina) y no se confirmen los resultados por medio de una tinción de Gram, circunstancias frecuentes en los análisis de rutina que efectúan diversos laboratorios. Esta levadura se agrega, pues, a los antecedentes, registrados por la bibliografía (ya mencionada), con la diferencia de que en este caso, la levadura no requiere otro microorganismo en asociación sinérgica para producir dichos resultados positivos falsos, contrariamente a lo que sucede con las asociaciones bacterianas:

*Staphylococcus aureus* - *Proteus vulgaris*,  
*Streptococcus faecalis* - *Salmonella schottmuelleri*, etc.

En consecuencia, los análisis bacteriológicos de coliformes deben ser realizados siempre con el control de una tinción de Gram, a menos que se tenga el cuidado de trabajar con medios con colorantes de trifenilmetano.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) American Public Health Association, 1966. Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd ed., APHA Inc., New York.
- 2) American Public Health Association, 1972. Standard Methods for the examination of Dairy Products, 13th ed., APHA Inc., New York.
- 3) Edwards, P. R. and W. H. Ewing, 1973. Identification of Enterobacteriaceae, 3rd ed., Burgess Pub. Co., Minneapolis, Minn.

- 4) Jørgensen, A., 1959. Microbiología de las fermentaciones industriales. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
  - 5) Folpmers, T., 1948. Is it justified to use lactose broth for the detection of *B. coli* in the presumptive test of routine water analysis? *Antoine van Leeuwenhoek*, 14: 58.
  - 6) Lodder, J., 1970. The yeast. A taxonomic study, North Holland Pub. Co., Amsterdam.
  - 7) North, W. R. Jr., 1960. Use of crystal violet or brilliant green dyes for the determination of salmonellae in dried food products. *J. Bact.* 80: 861.
  - 8) Salle, A. J., 1965. Bacteriología, Ed. Gustavo Gili S.A., Barcelona.
  - 9) Wattie, E., 1948. Relative Productivity of newer coliform media. *Pub. Health Reports*, 63: 268.
-